

06.07.98

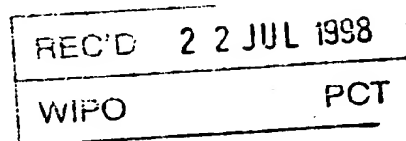
09/424815  
PCT/NL 98/00311

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 29 mei 1997 onder nummer 1006164,

ten name van:

**RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN**

te Leiden

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

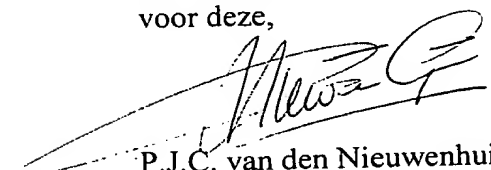
"Antimicrobiële peptiden",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Rijswijk, 6 juli 1998.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

  
P.J.C. van den Nieuwenhuijsen.

# 1006164

## UITTREKSEL

De uitvinding betreft het gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptidefragmenten voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier. Een van ubiquicidine afgeleid peptidefragment omvat bijvoorbeeld een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 7-13 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine:

KVHGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGP-NANS.

Hybridemoleculen omvatten bijvoorbeeld een kationische peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptidefragment van ubiquicidine en/of een afgeleide daarvan en een of meer effectormoleculen.

S. v. d. I.E.

28 JUL 1997

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het nieuwe medische gebruik van een op zichzelf bekend peptide, dat in deze aanvraag "ubiquicidine" genoemd zal worden. De uitvinding betreft verder nieuwe van dit

5 peptide afgeleide peptidefragmenten, eventueel in gemodificeerde vorm of voorzien van een (radioactief) label, en het gebruik hiervan in profylaxe, therapie en diagnostiek van infecties in mens en dier. Ook heeft de uitvinding betrekking op nieuwe antimicrobiële en diagnostische

10 middelen op basis van het peptide, de peptidefragmenten en/of gemodificeerde versies daarvan, eventueel in de vorm van combinatiepreparaten. Tenslotte verschaft de uitvinding nog een nieuwe methode voor het vervaardigen van van een radioactief label voorziene peptiden met

15 antimicrobiële activiteit.

Het gebruik van wat "klassieke" antibiotica genoemd worden is in steeds meer gevallen niet afdoende voor het behandelen van infectieziekten. Vele bacteriestammen hebben resistentie tegen de bekende klassen

20 antibiotica verworven en in de laatste dertig jaar zijn er geen nieuwe klassen antibiotica meer ontdekt. Tegen Mycobacteriën bestaan weinig of geen afdoende middelen. En ook andere micro-organismen, zoals fungi, en bepaalde parasieten zijn soms moeilijk te behandelen met bestaande

25 antimicrobiële middelen. Gezien het bovenstaande is een nieuwe klasse van antimicrobiële middelen zeer gewenst.

Momenteel hebben twee nieuwe typen antimicrobiële middelen de aandacht. Enerzijds zijn dat de koolhydraatachtige agentia. Daarnaast richt het onderzoek zich

30 op peptiden, met name (kationische) peptiden, met antimicrobiële activiteit. Kationische peptiden bevatten relatief veel positief geladen aminozuren, zoals arginine en lysine, en dragen daardoor een netto positieve lading, meestal van tenminste +2, maar vaak +4 of meer. Antimi-

35 crobiële peptiden zijn een belangrijke component van de natuurlijke afweer van de meeste levende organismen tegen infecties. Veel van dergelijke antimicrobiële peptiden zijn kationisch. Bij de mens en andere zoogdieren zijn

*Ant.*

dergelijke peptiden, zoals de defensines, een belangrijk eiwitachtig bestanddeel van bijvoorbeeld neutrofiele granulocyten. Deze cellen zijn reeds in een zeer vroeg stadium betrokken bij de afweer tegen micro-organismen en bij acute ontstekingsreacties. Daarnaast worden dergelijke peptiden ook door vele andere cellen, waaronder epitelcellen, die strategisch zijn gelocaliseerd ten opzichte van binnendringende micro-organismen, geproduceerd.

10 In het onderzoek dat leidde tot de onderhavige uitvinding werd gevonden dat het op zichzelf bekende peptide FAU S30 (dat thans door de onderhavige uitvinders "ubiquicidine" genoemd wordt) antimicrobiële werking heeft. Verder werd gevonden dat van dit peptide afgeleide peptide(fragmente)n eveneens in meer of mindere mate een antimicrobiële werking hebben. Deze peptide(fragmente)n als zodanig zijn niet eerder beschreven en derhalve nog nieuw.

Op basis van deze vaststelling verschaft de onderhavige uitvinding het gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptide(fragmente)n voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier.

25 Het voordeel van ubiquicidine en fragmenten daarvan is dat zij niet slechts een antimicrobiële werking hebben, maar dat zij zich in het lichaam tevens gericht naar de daadwerkelijke plaats van infectie begeven en aldaar accumuleren. Deze peptide(fragmente)n zijn derhalve infectiezoekend.

Met "antimicrobiële werking" wordt in deze aanvraag ieder remmend of anderszins negatief effect op bacteriën, virussen, protozoa, parasieten en schimmels bedoeld.

35 Met "ubiquicidine" wordt in deze aanvraag bedoeld een peptide van 6,654 kD met een aminozuursequentie, zoals weergegeven in figuur 1.

Van ubiquicidine afgeleide peptidefragmenten omvatten een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 7-13 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine zoals getoond in

5 figuur 1. Voor een gemiddelde deskundige is het eenvoudig vast te stellen of een peptidefragment met een uit de aminozuursequentie van ubiquicidine gekozen reeks bij voorkeur aaneengesloten aminozuren ook daadwerkelijk antimicrobiële activiteit heeft en zo voldoet aan de

10 uitvinding. Een eenvoudige standaardtest voor bepaling van antimicrobiële activiteit is bijvoorbeeld de alom bekende groei-killingstest, ofwel bepaling van de concentratie van een antimicrobieel middel dat 99% van de micro-organismen doodt (IC 99%). Met "peptide(fragmente)n" worden in deze aanvraag derhalve aangeduid alle

15 aminozuurketens, die kleiner zijn dan het ubiquicidine zelf, maar waarvan de aminozuursequentie wel bij voorkeur aaneengesloten is terug te vinden in het ubiquicidine. De lengte van dergelijke peptide(fragmente)n kan variëren

20 van 3 tot 58 aminozuren, waarbij eventuele extra aminozuren, die als modificatie worden toegevoegd, niet zijn meegenomen.

Voorbeelden van peptide(fragmente)n zijn de peptiden waarvan de sequentie is weergegeven in figuur 1.

25 Ubiquicidine (18-35)-D-alanine heeft als extra toevoeging een D-alanine aan beide uiteinden. Van de in figuur 1 getoonde peptidefragmenten hebben ubiquicidine (1-18), ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (29-41) de bijzondere voorkeur. In de bovenbeschreven test ligt de activiteit van deze fragmenten rond 1,5  $\mu\text{M}$ . Dit is een bijzonder goede antimicrobiële activiteit. Echter, in beginsel vallen alle boven gedefinieerde peptiden, die een of andere remmende werking op micro-organismen vertonen, binnen de uitvinding. Peptiden met een IC 99% van maximaal 25  $\mu\text{M}$ , bij voorkeur maximaal 10  $\mu\text{M}$ , meest bij voorkeur maximaal 1  $\mu\text{M}$  hebben echter de voorkeur.

35

Om hun activiteit te modificeren, bijvoorbeeld om deze nog verder te verhogen, of om afbraak door enzy-

men, met name peptidasen, te remmen of tegen te gaan, kunnen zowel het peptide (ubiquicidine) als de fragmenten op verschillende manieren gemodificeerd worden. Modificatie is elke afwijking van de van nature voorkomende  
5 aminozuurketen. Modificaties kunnen zijn het in tegengestelde volgorde aan elkaar koppelen van tenminste een deel van de aminozuren van het peptide of een peptide-fragment. Wanneer alle aminozuren van een peptide(fragment) zo zijn omgekeerd spreekt men van een "reverse  
10 peptide(fragment)".

Ook kunnen een of meer van de aminozuren uit het oorspronkelijke peptide(fragment) vervangen zijn door een stereoisomeer van dat aminozuur. In het lichaam komen de L-isomeren van aminozuren voor. De D-stereoisomeren  
15 kunnen veel minder gemakkelijk door in het lichaam aanwezige en bacteriële enzymen worden afgebroken. Een dergelijke modificatie zorgt ervoor dat het peptide(fragment) in het lichaam langer intact blijft en zijn werking langer kan uitoefenen. Een soortgelijke modificatie  
20 bestaat uit het uitbreiden van de oorspronkelijke aminozuurketen aan een of beide uiteinden met een of meer tegen afbraak beschermende groepen, zoals D-aminozuren, bijvoorbeeld D-alanine.

Alle op de hierboven beschreven wijze gemodificeerde of op andere wijze van het overeenkomende natieve peptide(fragment) afwijkende aminozuurketens zullen in deze aanvraag worden aangeduid met de term "afgeleide". Dit kunnen zowel afgeleiden van het ubiquicidine als van fragmenten daarvan zijn.

30 De uitvinding betreft verder zogeheten "hybridemoleculen", welke een (kationische) peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptidefragment en/of een afgeleide daarvan volgens de uitvinding omvatten samen met een of meer effectormoleculen. Het effectormo-  
35 lecuul kan verschillende vormen aannemen, zoals een aminozuurketen, die in staat is te binden aan een micro-organisme en/of door micro-organismen uitgescheiden of op het oppervlak daarvan tot expressie gebrachte stoffen.

Een voorbeeld van een dergelijk effectormolecuul is een endotoxinebindend peptide.

Een ander type effectormolecuul kan bestaan uit een viruseiwit. Een dergelijk viruseiwit-antimicrobieel peptide kan de gastheercel, waarin het te bestrijden micro-organisme zich bevindt, op de van een virus bekende wijze binnengaan en daarin kan het peptide zijn antimicrobiële werking uitoefenen.

Het effectormolecuul kan verder een detecteerbaar label zijn, zoals een radionuclide, gekozen uit de groep bestaande uit technetium 99m (Tc-99m), jood 123 (I-123) en 131 (I-131), broom 75 (B-75) en 76 (B-76), lood 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67) en 68 (Ga-68), arseen 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) en 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), koper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) en 67 (Cu-67), ijzer 52 (Fe-52), mangaan 52m (Mn-52m), chroom 51 (Cr-51), renium 186 (Re-186) en 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161) en Yttrium 90 (Y-90). Het radionuclide (ook wel "straler" genoemd) kan tevens een curatieve functie vervullen. Ook paramagnetische labels, zoals fluor 19 (F-19), natrium 23 (Na-23), fosfor 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), mangaan 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chroom 52 (Cr-52) en ijzer 56 (Fe-56) kunnen worden gebruikt.

Volgens de uitvinding kunnen eveneens combinaties van effectormoleculen aan het peptide gekoppeld zijn. Een voorbeeld daarvan zijn een celbindend peptide en een straler, waarbij het celbindende peptide en het antimicrobiële peptide zorgen voor een sturing van het hybridemolecuul naar de plaats van infectie en het antimicrobiële peptide en de straler voor behandeling of diagnose.

Hybridemoleculen van dit type, welke bestaan uit een antimicrobieel peptide, peptidefragment of afgeleide daarvan en tenminste een effectormolecuul zijn niet eerder beschreven. De "hybridemoleculen" volgens de uitvinding beperken zich derhalve niet tot het ubiquidine als antimicrobieel peptide, maar omvatten in het

algemeen hybridemoleculen welke een (kationische) peptide met antimicrobiële activiteit en/of fragmenten en/of afgeleiden daarvan omvatten. Voorbeelden van andere van dergelijke antimicrobiële peptides zijn  $\alpha$ - en  $\beta$ -defensines, 5 protegrines, serprocidines, magainines, PR-39, cecropines en andere (Martin et al. (1995) J. Leukocyte Biol. 58:128-136).

De uitvinding heeft betrekking op de hierboven uitgebreid beschreven varianten van het peptide of fragmenten 10 daarvan. Deze varianten alsmede het peptide en de fragmenten kunnen in deze aanvraag tevens gezamenlijk zijn aangeduid als "peptide(fragmente)n".

De uitvinding betreft verder een antimicrobieel middel, omvattende als actieve component ubiquicidine 15 en/of peptidefragmenten daarvan, afgeleiden van een van beiden en/of hybridemoleculen, die tenminste ubiquicidine of andere antimicrobiële kationische peptiden, en/of peptidefragmenten daarvan en/of afgeleiden daarvan bevatten voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe, monitoring 20 of therapie van infecties.

Het antimicrobiële middel volgens de uitvinding kan slechts de actieve component bevatten of de vorm hebben van een farmaceutische samenstelling, waarin een of meer andere dragers, verdunningsmiddelen en dergelijke 25 aanwezig zijn. Het middel en de samenstelling kunnen verschillende toedieningsvormen hebben, zoals bijvoorbeeld tablet, pil, capsule, injectie, infuus, zetpil, poeder, suspensie, oplossing, spray, emulsie, zalf, aerosol, pleister of crème en kunnen gebruikt worden voor 30 orale, anale, nasale, vaginale, intramusculaire, subcutane, intraveneuze, intraperitoneale of lokale (topische) toediening of toediening door middel van een katheter via natuurlijke of kunstmatige lichaamsopeningen. Zeer specifieke andere voorbeelden van toedieningsvormen zijn 35 tandpasta, tandvernis en met de actieve verbinding gecoate katheters. Deze laatste hebben een profylactische werking.



Samenstellingen volgens de uitvinding kunnen bereid worden door het combineren (d.w.z. mengen, oplossen etc.) van de actieve component(en) met farmaceutisch en farmacologisch acceptabele excipienten met een neutraal karakter (zoals waterige of niet-waterige oplosmiddelen, stabilisatoren, emulgatoren, detergentia, additieven), en verder indien noodzakelijk kleur-, geuren/of smaakstoffen. De concentratie van het (de) actieve component(en) in een farmaceutische samenstelling kan variëren tussen 0,001% and 100% (g/v), afhankelijk van de aard van de behandeling en de wijze van toedienen. De toe te dienen dosis hangt eveneens af van de wijze van toediening en aard van de behandeling. Voor de muis is bijvoorbeeld een dosis van 1 tot 10 µg/kg, bijvoorbeeld 4 µg/kg lichaamsgewicht geschikt. De samenstellingen volgens de uitvinding zijn geschikt voor behandeling van zowel mens als dier.

De uitvinding heeft verder betrekking op het ubiquicidine, op peptidefragmenten daarvan, op afgeleiden van een van beiden en op hybridemoleculen, die tenminste ubiquicidine of andere antimicrobiële kationische peptiden, en/of peptidefragmenten daarvan en/of afgeleiden daarvan bevatten voor gebruik in diagnostiek, profylaxe, therapie of monitoring van infecties.

Infecties, die met het middel behandeld kunnen worden, zijn bijvoorbeeld aandoeningen veroorzaakt door pathogene Gram-positieve (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes inclusief antibiotica-resistente stammen van S.aureus (ook wel Multidrug-Resistent S.aureus (MRSA) genoemd)) en Gram-negatieve ((antibioticum-resistente) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococcen en Salmonella typhimurium) bacteriën, moeilijk te behandelen micro-organismen, zoals Mycobacterium avium en Mycobacterium fortuitum, fungi (schimmels), zoals Candida albicans, Cryptococcus neoformans en Aspergillus fumigatus, virussen, in het bijzonder envelopvirussen, en parasieten, zoals Trypanosoma cruzi en Toxoplasma gondii.

Het gebruik van het middel is echter niet tot de hier genoemde infecties beperkt.

Doordat het peptide(fragment) volgens de uitvinding infectiezoekend is kan het zeer goed worden toegepast in de diagnostiek van infecties en daarmee gerelateerde pathologie. Indien voorzien van een detecteerbaar label, bijvoorbeeld een radioactief label, zoals technetium 99m, kan na verloop van tijd na toediening bijvoorbeeld door middel van scintigrafie worden bepaald waar in het lichaam zich het peptide(fragment) bevindt. Dit zal tevens de plaats zijn waar zich de te behandelen infectie bevindt. Een dergelijk gelabeld peptide(fragment) heeft derhalve een tweeledig doel. Niet slechts wordt aangetoond waar de infectie zich bevindt, maar tevens zal het peptide(fragment) door zijn aanwezigheid ter plaatse een antibiotische werking uitoefenen en zo de infectie verminderen. Op deze wijze kan ook het effect van de behandeling worden gevolgd door in de tijd de localisatie van het peptide te bekijken. Dit wordt "monitoring" genoemd.

In beginsel kan elk van de hierboven genoemde radionucliden gebruikt worden. De bijzondere voorkeur gaat echter uit naar technetium 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). De fysische halveringstijd van dit radionuclide bedraagt 6 uur en tezamen met het feit dat vooral gamma-straling wordt uitgezonden betekent dit voor de patiënt een geringe stralenbelasting. De relatief geringe halveringstijd heeft bovendien het klinische voordeel dat het onderzoek snel kan worden herhaald. Verder is dit radionuclide eenvoudig beschikbaar via de commercieel verkrijgbare Mo-Tc-nuclide-generator.

Met technetium 99m gelabelde peptide(fragmenten) blijken reeds na 15 minuten ter plaatse van de infectie gedetecteerd te kunnen worden. De accumulatie van bijvoorbeeld gallium 67 duurt tenminste 24 uur. Door de zeer snelle localisatie van met technetium 99m gelabelde peptide(fragmenten) is een snelle diagnose mogelijk. Bovendien is technetium 99m voornamelijk een  $\gamma$ -

straler met een zeer geringe hoeveelheid van de veel schadelijkere  $\beta$ -straling, zodat er een relatief lage stralingsbelasting voor de patiënt bestaat. Hierdoor is een frequentere toediening mogelijk. Daarnaast is nog

5 gebleken dat labeling met technetium 99m geen nadelige invloed heeft op de werking van het peptide(fragment). Bij proefdierexperimenten werden tot nu toe geen nadelige effecten, c.q. veranderde uiterlijke kenmerken van met  $^{99m}\text{Tc}$  gelabelde peptide(fragmente)n op de dieren gevonden.

10 Bovendien hebben in vitro studies aangetoond dat zeer hoge concentraties van de antimicrobiële peptide(fragmente)n niet toxisch zijn voor menselijke lichaamscellen. De bijzondere voorkeur gaat volgens de uitvinding derhalve uit naar met technetium 99m gelabelde kationische pepti-

15 den en fragmenten of afgeleiden daarvan als hybridemoleculen.

De peptide(fragmente)n volgens de onderhavige uitvinding tonen de infectie zelf aan en dus de plaats waar het micro-organisme zich in het lichaam bevindt.

20 Bekende beeldvormende methoden voor het opsporen van infecties, zoals röntgen, echografie en dergelijke, zijn gericht op het aantonen van morfologische veranderingen, die het gevolg zijn van een infectie. Het is echter zeer wel mogelijk dat de infectie zelf reeds verdwenen is,

25 terwijl de morfologische verandering nog bestaat. In dat geval wordt de behandeling van de infectie met bijvoorbeeld antibiotica gewoon doorgezet, terwijl deze eigenlijk niet meer nodig is. In beginsel heeft het de voorkeur om een behandeling met een bepaald antimicrobieel

30 middel zo kortdurend als mogelijk te laten zijn in verband met het ontstaan van resistenties of allergieën als gevolg van het middel. De peptide(fragmente)n volgens de uitvinding zijn infectiezoekend en komen derhalve op de plaats van de infectie zelf terecht en kunnen daar ook

35 zichtbaar gemaakt worden. Zodra de infectie verdwenen is blijkt dit uit het feit dat het peptide(fragment) niet langer ter plaatse van de (voormalige) infectie accumuleert. De behandeling kan dan gestopt worden.

Verder betreft de uitvinding combinatiepreparaten, welke naast ubiquicidine en/of een peptidefragment daarvan en/of een afgeleide daarvan en/of een hybridemolecuul een of meer andere actieve componenten bevatten.

- 5 Te denken valt bijvoorbeeld aan combinaties met "klassieke" antibiotica of met antivirale of antifungale middelen.

De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor het labelen van antimicrobiële peptiden, 10 in het bijzonder kationische peptiden, meer in het bijzonder ubiquicidine en daarvan afgeleide peptiden en defensines. Een dergelijke werkwijze omvat het in contact brengen van het te labelen peptide met een tin(II)-zout, een boorhydride en een radioactief label in de aanwezig- 15 heid van loog, zoals beschreven in Pauwels et al. (Nucl. Med. Biol. 20, 825-833 (1993)), maar waarbij het peptide gemodificeerd is met MAG3 (mercaptoacetyl glycine-glycine-glycine). Het gemodificeerde peptide wordt voorafgaand aan de labeling gedurende 10 minuten bij ongeveer 100°C 20 gehouden. In het bijzonder in geval van kleine peptiden of peptiden, die geen zwavelgroepen dragen, leidt de MAG3-modificatie tot aanzienlijk hogere labelingsefficiënties.

Het geheel wordt gedurende een bepaalde tijd, 25 bijvoorbeeld van 1 tot 60 minuten, bij voorkeur 5 to 30 minuten geroerd bij een geschikte temperatuur. De temperatuur hangt af van de temperatuurgevoeligheid van het peptide, maar zal meestal tussen kamertemperatuur en 40°C liggen, en bij voorkeur ongeveer 37°C zijn.

30 Het tin(II)-zout is bij voorkeur tin(II)pyrofosfaat. Het boorhydride is bij voorkeur natriumboorhydride of kaliumboorhydride. Het tin(II)-zout en het boorhydride worden voordeligerwijze gebruikt in een verhouding tussen 1:1 en 1:10, bij voorkeur 1:4 in hoeveelheden van respectievelijk 0.5-5  $\mu$ l en 2-10  $\mu$ l. Bij 35 voorkeur wordt als loog 0.1 M natronloog gebruikt.

Het radioactieve label is met voordeel  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetaat, maar ook  $^{186}\text{Re}$ -perrenaat kan worden ge-

bruikt. Van dergelijke radioactieve labels worden standaardoplossingen in de handel gebracht. In de werkwijze volgens de uitvinding wordt van een dergelijke oplossing 0,05-0,5 ml, bij voorkeur 0,1 ml gebruikt.

5 Een bijzonder voordelige manier voor het vervaardigen van ubiquicidine, en eventueel de fragmenten, afgeleiden en hybridemoleculen is door middel van transgene dieren. De werkwijze omvat daartoe het transformeren van een dierlijke eicel met een genconstruct dat codeert  
 10 voor het ubiquicidine, peptidefragment, afgeleide of hybridemolecuul, het uit de getransformeerde eicel regenereren van een transgeen dier en het uit een weefsel of lichaamsvloeistof van het dier, bijvoorbeeld melk, isoleren van het ubiquicidine, peptidefragment, afgeleide of  
 15 hybridemolecuul. Uiteraard kunnen de producten ook gesynthetiseerd worden.

De onderhavige uitvinding zal verder worden verduidelijkt aan de hand van de begeleidende voorbeelden, die slechts gegeven zijn ter illustratie, maar de  
 20 uitvinding niet beperken. In de voorbeelden wordt verwezen naar de volgende figuren waarin tonen:

- Figuur 1 Aminozuurvolgorde van ubiquicidine en afgeleide peptiden
- 25 Figuur 2 Antimicrobieel effect van ubiquicidine ten aanzien van Klebsiella pneumoniae en Staphylococcus aureus
- Figuur 3 Effect van ubiquicidine (18-35) op herpes simplex-virusinfectie van Vero-cellen
- Figuur 4 Effect van ubiquicidine (18-35) op Mycobacterium fortuitum  
 30
- Figuur 5 Effect van ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (18-29) op (antibioticum-resistente) Staphylococcus aureus
- 35 Figuur 6 Effect van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermde ubiquicidine (18-35) op Klebsiella pneumoniae

- Figuur 7 Snelheid van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) waarmee Staphylococcus aureus wordt geëlimineerd
- 5      Figuur 8 Effect van ubiquicidine (18-35) en D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) op (antibioticum-resistente) Staphylococcus aureus
- Figuur 9 Effect van D-alanine-beschermd ubiquicidine (18-35) op (antibioticum-resistente) Escherichia coli
- 10    Figuur 10 Scintigram van intraperitoneaal toegediende <sup>99m</sup>technetium-gelabelde ubiquicidine (18-35) in Staphylococcus aureus-geïnfecteerde muis
- Figuur 11 Schematische weergave van de experimentele infectie en behandeling van muizen
- 15    Figuur 12 Accumulatie van <sup>99m</sup>technetium-gelabelde ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18), defensines en humaan IgG in de Klebsiella pneumoniae-geïnfecteerde dijspier
- 20    Figuur 13 Effect van ubiquicidine (18-35), ubiquicidine (1-18) en defensines op een experimentele infectie met Staphylococcus aureus en Escherichia coli

## VOORBEELDEN

### 25 VOORBEELD 1

#### Antimicrobiële werking van ubiquicidine

##### 1. Inleiding

Door middel van gelfiltratie en reverse phase HPLC werd een peptide geïsoleerd uit de cytosol-fractie

30 van met interferon- $\gamma$  geactiveerde RAW 264.7 macrofagen van de muis en op verschillende manieren gestimuleerde cellen van de humane H292 luchtwegepitheelcellijn. Deze laatste konden worden gestimuleerd met bacteriële producten (endotoxine, lipoteichoïnezuur), forbolester, en

35 luchtwegpathogenen (Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae en parainfluenza virus 3). Het geïsoleerde peptide werd ubiquicidine genoemd.

## 2. Materialen en methode

### 2.1. Isolatie van ubiquicidine

De methode om ubiquicidine te isoleren uit cytosolfracties van cellen werd eerder beschreven voor de  
5 isolatie van antimicrobiële eiwitten uit cellysaten en celmembraanfracties (Hiemstra et al. (1993) Infect.Immun. 61:3038-3046). De cellen werden gekweekt in RPMI 1640 medium met antibiotica en 10% hitte-geïnactiveerd foetaal kalfs-serum. Vervolgens werden de cellen geoogst, gewassen  
10 en opgenomen in 10 mM natriumfosfaatbuffer (pH 7,4) verrijkt met een cocktail van proteaseremmers.

Met behulp van stikstofcavitatie werd een cellysaat verkregen waarna door middel van ultracentrifugering met 27.000xg een membraanfractie en een cytosol-  
15 fractie werden verkregen. De eiwitten in de cytosolfractie werden geëxtraheerd met behulp van 5% azijnzuur en het zure extract werd gedialyseerd en vervolgens op een P60 kolom gebracht.

De fracties afkomstig van deze kolom werden  
20 onderzocht op antimicrobiële activiteit. De ubiquicidine-bevattende fracties werden gepoold en door middel van HPLC verder gescheiden op een C18 kolom met heptafluorboterzuur als "ion pairing molecule" in het eluens. De HPLC-fracties werden eveneens onderzocht op antimicro-  
25 biële activiteit en immunoreactiviteit met behulp van een antiserum tegen het N-terminale deel van het ubiquicidine. De gepoolde fracties bevatten zuiver ubiquicidine.

### 2.2. Biochemische karakterisering

30 De volgorde van de N-terminale aminozuren van gezuiverd ubiquicidine werd bepaald door middel van geautomatiseerde Edman-degradatie en een peptidesequencer 477A uitgerust met een PTH-aminozuuranalysator 120A (Applied Biosystems, Foster City, CA). De sequentieresul-  
35 taten werden vervolgens met behulp van het GeneWorks-pakket (Intelligenetics, Mountain View, CA) geanalyseerd. Molecuulgewicht van ubiquicidine werd met behulp van massaspectrometrie (laser desorption time-of-flight

massaspectrometry; Lasermat, Finnigan MAT LTD, Hemel Hempstead, UK) bepaald. Voor de immunologische identificatie van ubiquicidine werd gebruik gemaakt van een konijn-antiserum specifiek voor het N-terminale deel van ubiquicidine (ubiquicidine 1-18) en Western blotting.

### 2.3. Testen van antimicrobiële activiteit in vitro

Voor het onderzoek naar de antimicrobiële activiteit van ubiquicidine en hiervan afgeleide peptiden werden verschillende technieken gebruikt. De gel-overlay-bepaling en de radiale diffusiebepaling zijn eerder beschreven (Hiemstra et al. (Infect. Immun. 63, 3038-3046 (1993)). In de groei-killingscurvebepaling, welke gebruikt werd om de IC 99% van het peptide te onderzoeken, worden (mid-log of stationaire fase) bacteriën (Klebsiella pneumoniae (A) en Staphylococcus aureus (B) gedurende 60 minuten bij 37°C aan oplopende concentraties van het ubiquicidine blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën in de suspensie bepaald wordt met behulp van microbiologische plaattechnieken (Colony Forming Units, CFU). Als negatieve controles werden bacteriën blootgesteld aan peptide 4 (een synthetisch peptide afgeleid van HIV glycoproteïne 120), ubiquicidine 18-29 of geen peptide.

De resultaten van dergelijke experimenten worden in CFU's weergegeven in figuur 2.

### 3. Resultaat

Het ubiquicidine is een 6,7 kD ribosomaal kationisch peptide met een pI van 12,67. Uit sequentiebepaling van de 18 N-terminale aminozuren van het geïsoleerde peptide bleek dat deze volledig overeenkwamen met het N-terminale deel van het S30 deel van het expressieproduct van het Finkel-Biskis-Reilly muis-sarcoma geassocieerde ubiquitair tot expressie gebrachte (FAU) gen dat onder andere voorkomt in de mens en de muis. Ook het molecuulgewicht van het FAU S30 en het ubiquicidine bleek



overeen te komen. Derhalve wordt ervan uitgegaan dat het hier hetzelfde peptide betreft.

Uit de bepaling van de antimicrobiële werking in vitro van ubiquicidine bleek dat het ubiquicidine zeer  
 5 snel (< 10 minuten) verschillende micro-organismen effectief (3-4 logreductie) kan doden. Figuur 2 toont mid-log Klebsiella pneumoniae (A) en Staphylococcus aureus (B), welke gedurende 60 minuten bij 37°C aan oplopende concentraties gezuiverd ubiquicidine in 10 mM natriumfosfaat-  
 10 buffer waren blootgesteld. In de controle-incubaties vermenigvuldigden de bacteriën zich enige malen (niet getoond). De minimale remmende concentratie voor genoemde micro-organismen bleek tussen de 0,08 en de 0,16  $\mu$ M te liggen, 1,5  $\mu$ M ubiquicidine elimineert Klebsiella pneumo-  
 15 niae (A) bijna volledig, terwijl de reductie in het aantal Staphylococcus aureus (B) 2-log bedraagt.

## VOORBEELD 2

### Antimicrobiële werking van peptidefragmenten

#### 20 1. Inleiding

Van het natieve ubiquicidine werd een aantal peptidefragmenten afgeleid en de antimicrobiële activiteit daarvan bepaald.

#### 25 2. Materialen en methoden

##### 2.1. Productie synthetische peptiden

Peptiden werden met behulp van een Abimed AMS multiple peptide synthesizer en een vaste fase (tentagel AC, een polymeer van polyethyleenglycolspacer gekoppeld  
 30 aan een polystyreenmatrix) vervaardigd (de Koster et al. (1995) J. Immunol. Methods 187:179-188). Na voltooiing van de synthese werd het peptide van de vaste fase losgekoppeld met behulp van een trifluorazijnzuur-water(19:1)-mengsel en vervolgens werden de peptiden geprecipiteerd  
 35 met een ether-pentaaan(1:1)-mengsel bij 20°C. Na centrifugering werden de verkregen peptiden gedroogd bij 40°C gedurende 15 minuten. Vervolgens werden de peptiden opgelost in 10% azijnzuur en geconcentreerd door middel

van vacuümcentrifugering. De zuiverheid van de peptiden werd bepaald met behulp van HPLC. Een overzicht van de gesynthetiseerde peptiden afgeleid van ubiquicidine is in figuur 1 gegeven. Van deze peptidefragmenten werd de antimicrobiële activiteit bepaald zoals beschreven in voorbeeld 1 onder 2.3.

#### 2.2. Antimicrobieel effect op Herpes Simplex Virus (HSV)

HSV werd gedurende 60 minuten geïncubeerd met oplopende concentraties van het peptidefragment ubiquicidine (18-35) bij 37°C. Vervolgens werd het viruspreparaat in diverse verdunningen aan Vero-cellen toegevoegd. Na 3 dagen bij 37°C werd het cytopathogene effect van het virus op Vero-cellen bepaald, waarmee tenslotte de virus-titer kon worden berekend. Figuur 3 toont het resultaat.

#### 2.3. Antimicrobieel effect op Mycobacterium fortuitum

Ongeveer  $10^6$  Mycobacterium fortuitum werden gedurende verschillende intervallen bij 37°C geïncubeerd met 14  $\mu\text{M}$  of 52  $\mu\text{M}$  ubiquicidine (18-35) en vervolgens werd het aantal levende mycobacteriën in de suspensies bepaald met behulp van microbiologische technieken. Het resultaat wordt getoond in figuur 4.

#### 2.4. Antimicrobieel effect op Staphylococcus aureus

Ongeveer  $10^6$  bacteriën van multidrug-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) en antibioticum-gevoelige S. aureus werden gedurende 60 minuten bij 37°C aan verschillende concentraties ubiquicidine (18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën in de suspensies microbiologisch werd bepaald. Als negatieve controle werden hoge concentraties ubiquicidine (18-29), peptide 4 en geen peptide gebruikt. Het resultaat wordt getoond in figuur 5.

35

### 3. Resultaten

Onderzoek naar het effect van de verschillende peptiden op Klebsiella pneumoniae en Staphylococcus

aureus toonde antimicrobiële activiteit van ubiquicidine (1-18), ubiquicidine (18-35) en ubiquicidine (29-41). De andere peptiden bleken aanzienlijk minder potent dan wel inactief.

5 In figuur 3 worden de resultaten getoond van het experiment met HSV. Hieruit blijkt dat een toenemende concentratie peptide een afname in de virustiter tot gevolg heeft.

Figuur 4 toont dat ubiquicidine (18-35) M.  
 10 fortuitum doodt gedurende een periode van 3 uur, waarna het peptide vervolgens een bacteriostatisch effect vertoont. Herhaalde toediening op 3 en 7 uur na de eerste dosis resulteert in een nagenoeg volledige eliminering van de mycobacteriën. In de controle-incubaties bleek M.  
 15 fortuitum te prolifereren. In additionele controle-experimenten werd geen aanwijzing voor klontering van de mycobacteriën door ubiquicidine (18-35) gevonden (niet getoond).

Uit figuur 5 blijkt dat het peptidefragment  
 20 ubiquicidine (18-35) een duidelijk afname in het aantal CFU's van verschillende Staphylococcus aureus stammen tot gevolg heeft.

### VOORBEELD 3

#### 25 Gemodificeerde peptidefragmenten en hun activiteit

##### 1. Inleiding

Een aantal van de in voorbeeld 2 beschreven peptide(fragmente)n werd verder op verschillende manieren gemodificeerd door aan het begin en/of einde een extra D-  
 30 alanine ter bescherming tegen exopeptidase-activiteit. Van enkele op deze wijze verkregen "afgeleiden" werd eveneens de antimicrobiële activiteit bepaald.

##### 2. Materialen en methoden

#### 35 2.1. Productie gemodificeerde peptiden

D-alanine-beschermde peptiden werden vervaardigd zoals eerder beschreven (voorbeeld 2, ad 2.1) in deze aanvraag.

## 2.2. Antimicrobieel effect op Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus ( $5 \times 10^5$  bacteriën) werd gedurende verschillende perioden bij  $37^\circ\text{C}$  aan  $7 \mu\text{M}$  ubiquidine (18-35) en met D-alanine beschermd ubiquidine  
5 (18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën in de suspensie microbiologisch werd gekwantificeerd.

Verder werden verschillende stammen (multidrug-resistente) Staphylococcus aureus gedurende 60 minuten bij  $37^\circ\text{C}$  met oplopende concentraties met D-alanine beschermd en onbeschermd ubiquidine (18-35) geïncubeerd,  
10 waarna het aantal levende bacteriën in de verschillende suspensies microbiologisch werd bepaald.

## 2.3. Antimicrobieel effect op Klebsiella pneumoniae

15 Ongeveer  $5 \times 10^6$  Klebsiella pneumoniae werden gedurende 60 minuten bij  $37^\circ\text{C}$  aan oplopende concentraties ubiquidine (18-35) en met D-alanine beschermd ubiquidine (18-35) blootgesteld en vervolgens werd het aantal levende bacteriën microbiologisch gemeten.

20

## 2.4. Antimicrobieel effect op Escherichia coli

Ongeveer  $10^6$  antibioticum-resistente Escherichia coli en antibioticum-gevoelige E. coli (moederstam van de resistente bacterie) werden gedurende 60 minuten bij  $37^\circ\text{C}$   
25 aan oplopende concentraties met D-alanine beschermd ubiquidine (18-35) blootgesteld, waarna het aantal levende bacteriën microbiologisch werd bepaald.

## 3. Resultaten

30 Vergelijking van antimicrobiële activiteiten van het met D-alanine beschermde en het onbeschermd ubiquidine (18-35) ten aanzien van Klebsiella pneumoniae in vitro toonde aan dat de met de D-alanine beschermde variant veel potenter is in het elimineren van de bacteriën dan het onbeschermd ubiquidine (18-35)-peptide  
35 (figuur 6).

Het maximale dodingseffect door beide varianten van ubiquidine (ubiquidine (18-35) en met D-alanine

beschermde ubiquicidine (18-35)) op Staphylococcus aureus werd binnen 15 minuten bereikt (figuur 7). De snelheid van eliminatie van Staphylococcus aureus bacteriën door de beide typen ubiquicidinepeptiden is identiek (figuur 7).

De resultaten toonden verder aan dat de met D-alanine beschermde ubiquicidine effectiever (multidrug-resistente) Staphylococcus aureus doodt dan de onbeschermde variant (figuur 8).

10 Zeer verrassend is de observatie dat het met D-alanine beschermde ubiquicidine (18-35) veel effectiever antibioticum-resistente Escherichia coli dan de antibioticum-gevoelige moederstam van Escherichia coli kan doden (figuur 9). 1  $\mu\text{M}$  met D-alanine beschermde ubiquicidine  
15 reduceert het aantal antibioticum-resistente bacteria tot beneden de detectiegrens. Een vergelijkbaar antimicrobieel effect ten opzichte van de moederstam wordt pas bereikt met 14  $\mu\text{M}$  van het peptide. Deze gegevens tonen dat antibioticum-resistente bacteriën heel effectief  
20 geëlimineerd kunnen worden door peptiden afgeleid van ubiquicidine.

#### VOORBEELD 4

##### Met Technetium 99m gelabelde peptidefragmenten

#### 25 1. Inleiding

Er werd een hybridemolecuul vervaardigd door de peptidefragmenten te labelen met de straler  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Dit voorbeeld illustreert de wijze van labelen volgens de uitvinding.

30

#### 2. Materialen en methode

Het labelen van peptide D (ubiquicidine (18-35)) en de met D-alanine beschermde ubiquicidine (18-35) met  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  werd uitgevoerd met behulp van een werkwijze volgens de uitvinding. Hiertoe werd 10  $\mu\text{l}$  van een  
35 MAG3-gederivatiseerde peptideoplossing (2 mg/ml in 0,01 M natriumfosfaat pH 3,0) toegevoegd aan 2  $\mu\text{l}$  van een tin(I-I)pyrofosfaatoplossing (0,5 mg/ml). Onmiddellijk daarna

werd 4  $\mu$ l van een 10 mg/ml  $\text{KBH}_4$ -oplossing (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, VS) in 0,1 M NaOH toegevoegd. Na het bijvoegen van 0,1 ml van een  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -natriumpertechne-  
 5 taatoplossing (20 MBq, Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Nederland) werd het mengsel geroerd bij kamertemperatuur gedurende 30 minuten.

De radiochemische zuiverheid van met  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  gelabelde peptiden werd bepaald na precipitatie met 20% trichloorazijnzuur (TCA), instantane dunne-laagchromatografie (ITLC) en HPLC. Dit gebeurde in het kort door  
 10 20  $\mu$ l van een vers bereid  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -defensine-1 of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG te analyseren op een superose 12 kolom (Pharmacia, Upsala, Zweden), gekoppeld aan een LKB Bromma HPLC 2249 chromatografiepomp (LKB, Upsala, Zweden) en een on-line NAI  
 15 (Tl)-crystal-gamma-detectiesysteem (Raytest Steffi, Duitsland). De buffer, die gebruikt werd voor het analyseren van de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gelabelde verbindingen, was 14 mM natriumfosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS) pH 7,5 met een stroomsnelheid van 1 ml/minuut. Labelingsopbrengsten van  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -  
 20 gelabelde peptiden werden bepaald na precipitatie met 20% TCA, HPLC-analyse en ITLC-analyse en waren respectievelijk meer dan 90%, meer dan 90% en meer dan 95%.

## VOORBEELD 5

### 25 Accumulatie van het gelabelde peptide op de plaats van infectie

#### 1. Inleiding

Om aan te tonen dat het peptide(fragment) volgens de uitvinding infectiezoekend is werd de localisatie van  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gelabelde peptiden (ubiquicidine (18-35),  
 30 ubiquicidine (1-18) en defensines alsmede, als controle, IgG) met behulp van een  $\gamma$ -camera bepaald.

#### 2. Materialen en methode

35 Muizen werden intramusculair geïnfecteerd met ongeveer  $10^6$  Staphylococcus aureus bacteriën (ATCC 25923) en vervolgens intraperitoneaal geïnjecteerd met 25  $\mu$ g  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -peptide. Op verschillende tijdstippen na injectie van het

peptide werd de radioactiviteit in de circulatie (hart), bepaalde organen (lever, nier, blaas en milt) en in beide dijspieren met behulp van een  $\gamma$ -camera gemeten. Accumulatie van het gelabelde peptide op de plaats van infectie in de rechter dijspier wordt weergegeven in Figuur 10.

### 3. Resultaten

De resultaten toonden een zeer korte halfwaardetijd van de peptiden in de circulatie, namelijk  $t_{\text{half}} < 15$  minuten. Het grootste deel van de geïnjecteerde gelabelde peptiden ( $> 60\%$ ) wordt via de lever, nieren en blaas verwijderd, maar een deel van de peptiden (1-2% van de geïnjecteerde dosis) komt op de plaats van infectie in de dijspier terecht (figuur 10).

### VOORBEELD 6

#### Antimicrobiële activiteit in vivo

##### 1. Inleiding

Van een aantal ubiquicidinefragmenten werd de accumulatie en antimicrobiële activiteit in vivo bepaald.

##### 2. Materialen en methoden

###### 2.1. Infectiemodel

Voor een schematische weergave van de experimentele infectie en behandeling van de muizen wordt verwezen naar figuur 11. Samenvattend, werden muizen intramusculair in de rechterdijspier geïnfecteerd met ongeveer  $10^6$  bacteriën en na 5 minuten intraperitoneaal geïnjecteerd met ongeveer 25  $\mu\text{g}$  (gelabeld) peptide. Op verschillende tijdstippen na injectie van het peptide werden de dieren gedood en de rechter dijspier verwijderd, gehomogeniseerd, en tenslotte werd het aantal bacteriën in het homogenaat bepaald met behulp van microbiologische plaattechnieken of werd accumulatie van het gelabelde peptide bepaald door middel van een  $\gamma$ -camera.

## 2.2. Infectiezoekend effect van peptiden volgens de uitvinding

Muizen werden in de rechter dijspier geïnfecteerd met Klebsiella pneumoniae en vervolgens werd intraperitoneaal 25  $\mu\text{g}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gelabeld ubiquicidine (1-18) of  
5 ubiquicidine (18-35) geïnjecteerd. Op verschillende tijdstippen na injectie van het peptide werd de hoeveelheid activiteit in de rechter (test) en linker (controle) dijspier van de muis met behulp van een  $\gamma$ -camera gemeten. De resultaten zijn weergegeven in figuur 12 als een ratio  
10 van de waarden in de rechter dijspier en de linker dijspier, dat wil zeggen "target-to-non-target ratio". Ter vergelijking zijn ook de resultaten voor humane defensine en IgG weergegeven.

## 15 2.3. Effect van antimicrobiële peptiden op experimentele infecties

Muizen werden in de rechter dijspier geïnfecteerd met Klebsiella pneumoniae (A) of Staphylococcus aureus (B). 5 minuten later werd 25  $\mu\text{g}$  ubiquicidine (18-  
20 35) of ubiquicidine (1-18) intraperitoneaal geïnjecteerd. 24 uur na toediening van het peptide werden de dieren gedood en het aantal bacteriën in de rechter dijspier microbiologisch gekwantificeerd. Als positieve controle worden dieren intraperitoneaal geïnjecteerd met humaan  
25 defensine en als negatieve controle met het oplosmiddel van de antimicrobiële peptiden. Het resultaat staat in figuur 13.

## 3. Resultaten

30 De accumulatie van de onderzochte peptiden bleek maximaal op 4 uur na toediening en neemt vervolgens in de loop van de tijd af (figuur 12). Opvallend is dat de maximale accumulatie van  $^{99}\text{Tc}$ -ubiquicidine (1-18) en  $^{99}\text{Tc}$ -ubiquicidine (18-35) veel eerder bereikt wordt dan  
35  $^{99}\text{Tc}$ -IgG. Deze waarneming impliceert dat  $^{99}\text{Tc}$ -ubiquicidine-peptiden van belang kunnen zijn voor een snellere diagnostiek van infecties. Vergelijkbare resultaten werden



gevonden indien het  $^{99}\text{Tc}$ -peptide 24 uur na infectie intraveneus werd toegediend.

De bovengenoemde farmacologische data tonen dat ubiquicidine (1-18) en ubiquicidine (18-35) snel accumuleren in de geïnfecteerde dijspier. De resultaten van onze experimenten naar het effect van deze peptiden op het aantal bacteriën in de spier tonen dat ubiquicidine (18-35) effectiever bacteriën elimineert dan ubiquicidine (1-18) en defensines (figuur 12). Deze in vivo resultaten komen heel goed overeen met de resultaten van de in vitro experimenten.

Uit figuur 13 blijkt dat met name ubiquicidine (18-35) ook in vivo een duidelijk bacteriedodend effect heeft, dat beter is dan dat van defensine.

## CONCLUSIES

1. Gebruik van ubiquicidine of daarvan afgeleide, eventueel gemodificeerde peptidefragmenten voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling, diagnostiek of profylaxe van infecties in mens en dier.

5           2. Van ubiquicidine afgeleid peptidefragment, omvattende een bij voorkeur aaneengesloten reeks van tenminste 3, bij voorkeur tenminste 7-13 aminozuren uit de aminozuursequentie van ubiquicidine:

KVHGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVPVPTFGKKKGP-

10 NANS.

3. Peptidefragment volgens conclusie 2 met een van de volgende aminozuursequenties:

|    |                      |                    |
|----|----------------------|--------------------|
|    | ubiquicidine (1-18)  | KVHGSLARAGKVRGQTPK |
|    | ubiquicidine (29-41) | TGRAKRRMQYNRR      |
| 15 | ubiquicidine (18-29) | KVAKQEKKKKKT       |
|    | ubiquicidine (18-35) | KVAKQEKKKKKTGRAKRR |
|    | ubiquicidine (29-35) | TGRAKRR            |
|    | ubiquicidine (42-59) | FVNVPVPTFGKKKGP    |
|    | ubiquicidine (36-41) | NANS               |

20           4. Afgeleide van ubiquicidine of van een peptidefragment volgens conclusies 2 of 3, welke afgeleide een aminozuurvolgorde heeft, die ten minste ten dele tegengesteld is aan de aminozuurvolgorde van het overeenkomende oorspronkelijke peptide(fragment) (zogenoeten "(partieel)  
25 reverse peptide").

5. Afgeleide van een ubiquicidine of van een peptidefragment volgens conclusies 2, 3 of 4, waarbij tenminste een van de aminozuren uit het oorspronkelijke peptide(fragment) is vervangen door een stereoisomeer van  
30 dat aminozuur.

6. Afgeleide van ubiquicidine of van een peptidefragment volgens conclusies 2-5, waarbij de oorspronkelijke aminozuurketen aan een of beide uiteinden daarvan is uitgebreid met een of meer tegen afbraak beschermende  
35 groepen, zoals D-aminozuren.

7. Afgeleide volgens conclusie 6 met de aminozuurvolgorde:

D-A--KVAKQEKKKKKTGRAKRR--D-A

waarin D-A staat voor D-alanine.

5           8. Hybridemolecuul, omvattende een kationische peptide met een antimicrobiële werking en/of een peptide-fragment volgens conclusie 2 of 3 en/of een afgeleide daarvan volgens conclusies 4-7, en een of meer effectormoleculen.

10           9. Hybridemolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een aminozuurketen omvat, die in staat is te binden aan een micro-organisme en/of door micro-organismen uitgescheiden of op het oppervlak daarvan tot expressie gebrachte stoffen.

15           10. Hybridemolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een endotoxinebindend peptide is.

          11. Hybridemolecuul volgens conclusie 8, waarbij het effectormolecuul een detecteerbaar label is.

20           12. Hybridemolecuul volgens conclusie 11, waarbij het detecteerbare label een radionuclide is, gekozen uit de groep bestaande uit technetium 99m (Tc-99m), jood 123 (I-123) en 131 (I-131), broom 75 (B-75) en 76 (B-76), lood 203 (Pb-203), gallium 67 (Ga-67) en 68 (Ga-68), arseen 72 (As-72), indium 111 (In-111), 113m (In-113m) en 114m (In-114m), ruthenium 97 (Ru-97), koper 62 (Cu-62), 64 (Cu-64) en 67 (Cu-67), ijzer 52 (Fe-52), mangaan 52m (Mn-52m), chroom 51 (Cr-51), renium 186 (Re-186) en 188 (Re-188), terbium 161 (Tb-161),  
25   Yttrium 90 (Y-90), fluor 19 (F-19), natrium 23 (Na-23), fosfor 31 (P-31), gadolinium 157 (Gd-157), mangaan 55 (Mn-55), dysprosium 162 (Dy-162), chroom 52 (Cr-52) en  
30   ijzer 56 (Fe-56).

          13. Hybridemolecuul volgens conclusie 8, waarbij het kationische peptide met antimicrobiële activiteit is gekozen uit  $\alpha$ - en  $\beta$ -defensines, ubiquicidine, protegrines, serprocidines, magainines, PR-39, cecropines.

14. Peptidefragmenten volgens conclusies 2 en 3 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe of therapie van infecties in mens en dier.

15. Afgeleiden volgens conclusies 4-7 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe of therapie van infecties in mens en dier.

16. Hybridemoleculen volgens conclusies 8-13 voor gebruik in de diagnostiek, profylaxe, therapie of monitoring van infecties in mens en dier.

17. Peptidefragmenten volgens conclusie 14, afgeleiden volgens conclusie 15 of hybridemoleculen volgens conclusie 16, waarbij de microbiële infecties zijn veroorzaakt door pathogene Gram-positieve (Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes inclusief antibiotica-resistente stammen van S.aureus (ook wel Multidrug-Resistent S.aureus (MRSA) genoemd)) en Gram-negatieve ((antibiotica-resistente) Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, enterococcen en Salmonella typhimurium) bacteriën, moeilijk te behandelen micro-organismen, zoals Mycobacterium avium en Mycobacterium fortuitum, fungi (schimmels), zoals Candida albicans, Cryptococcus neoformans en Aspergillus fumigatus, virussen, in het bijzonder envelopvirussen, en parasieten, zoals Trypanosoma cruzi en Toxoplasma gondii.

18. Antimicrobieel middel, omvattende tenminste een geschikte hoeveelheid van een of meer actieve componenten, gekozen uit ubiquicidine, peptidefragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridemoleculen volgens conclusies 8-13, eventueel in de aanwezigheid van een of meer geschikte excipienten.

19. Antimicrobieel middel volgens conclusie 18 voor gebruik in therapie en profylaxe in mens en dier.

20. Diagnostisch middel, omvattende een geschikte hoeveelheid van een of meer van een detecteerbaar label voorziene actieve componenten, gekozen uit ubiquicidine, peptidefragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridemoleculen volgens conclusies 8-13.

21. Diagnostisch middel volgens conclusie 19 voor gebruik in diagnostiek en monitoring.

22. Werkwijze voor het labelen van een kationisch peptide met antimicrobiële werking, omvattende het  
5 in contact brengen van het te labelen peptide met een tin(II)-zout, een boorhydride en een radioactief label in de aanwezigheid van loog, waarbij het peptide gemodificeerd is met MAG3 (mercaptopacetyl glycine-glycine-glycine).

10 23. Werkwijze volgens conclusie 22 waarbij het tin(II)-zout en het boorhydride respectievelijk tin(I-I)pyrofosfaat en natriumboorhydride of kaliumboorhydride zijn, welke gebruikt worden in een verhouding tussen 1:1 en 1:10, bij voorkeur 1:4 in hoeveelheden van respectie-  
15 velijk 0.5-5  $\mu$ l en 2-10  $\mu$ l, waarbij het radioactieve label een standaardoplossing van  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetaat of  $^{186}\text{Re}$ -perrenaat is in een hoeveelheid van 0,05-0,5 ml, bij voorkeur 0,1 ml, waarbij het loog natronloog is en de loogconcentratie 0,5-5 M, bij voorkeur 0,1 M, en waarbij  
20 het geheel gedurende 1 tot 60 minuten, bij voorkeur 5 to 30 minuten geroerd wordt bij een temperatuur tussen kamertemperatuur en 40°C, en bij voorkeur bij ongeveer 37°C.

24. Werkwijze voor het vervaardigen van ubiqui-  
25 cidine, peptidefragmenten volgens conclusies 2 en 3, afgeleiden volgens conclusies 4-7, hybridemoleculen volgens conclusies 8-13 door het transformeren van een dierlijke eicel met een genconstruct dat codeert voor het ubiquicidine, peptidefragment, afgeleide of hybridemole-  
30 cuul, het uit de getransformeerde eicel regenereren van een transgeen dier en het uit een weefsel of lichaamsvloeistof van het dier, bijvoorbeeld melk, isoleren van het ubiquicidine, peptidefragment, afgeleide of hybride-molecuul.

PEPTIDE

Ubiquitin: KVGSLARAGKVRGQTPKVAKQEKKKKKTGRAKRRMQYNRRFVNVVPTFGKKKGPNANS

(59aa, 6.654 kD)

(1-18, 2.153 kD) KVGSLARAGKVRGQTPK

(29-41, 1.910 kD) TGRAKRRMQYNRR

(18-29, 1.643 kD) KVAKQEKKKKKT

(18-35, 3.477 kD) KVAKQEKKKKKTGRAKRR

(18-35, 3.656 kD) AKVAKQEKKKKKTGRAKRR

(29-35, 953 D) TGRAKRR

(42-59, 2.213 kD) FVNVVPTFGKKKGPNANS

(36-41, 957 D) MQYNRR

FIG.1

1006164

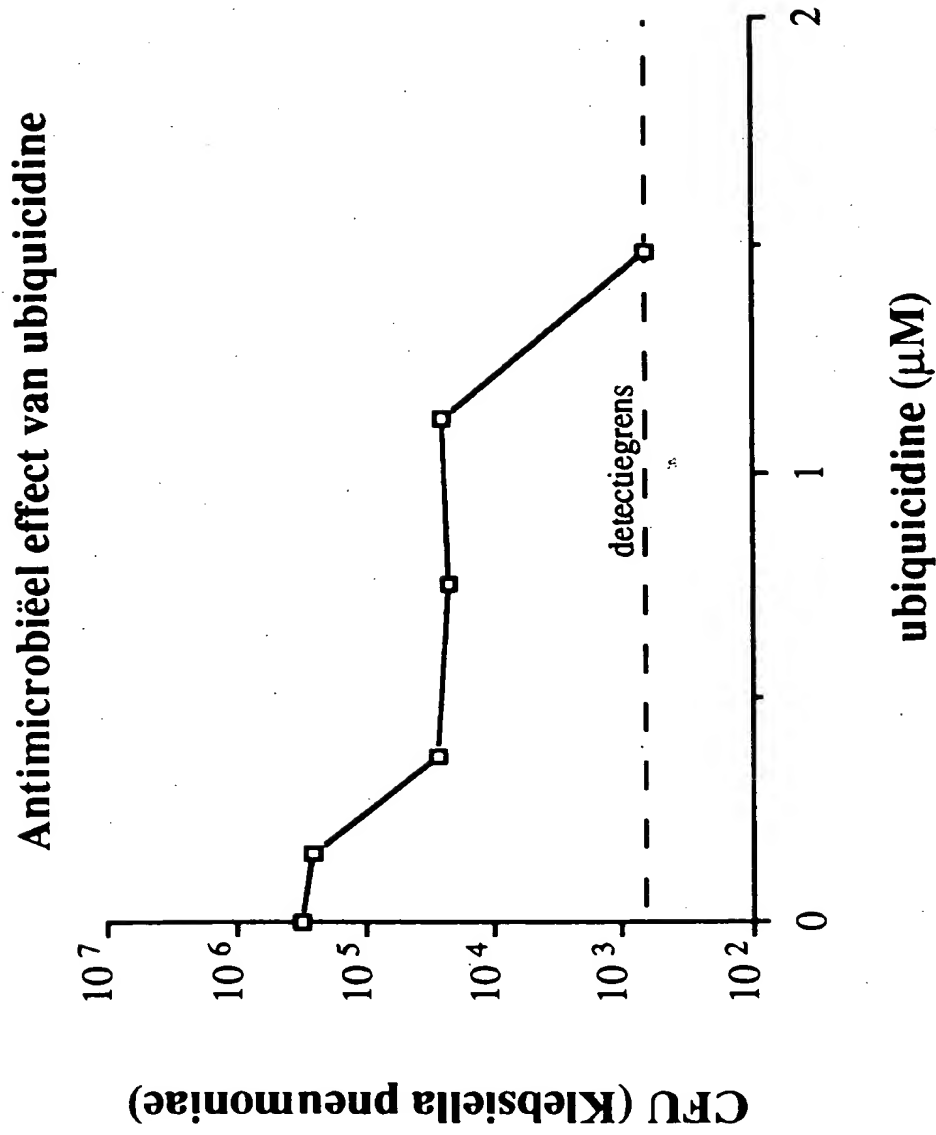


FIG. 2A

10/11/15

1006164

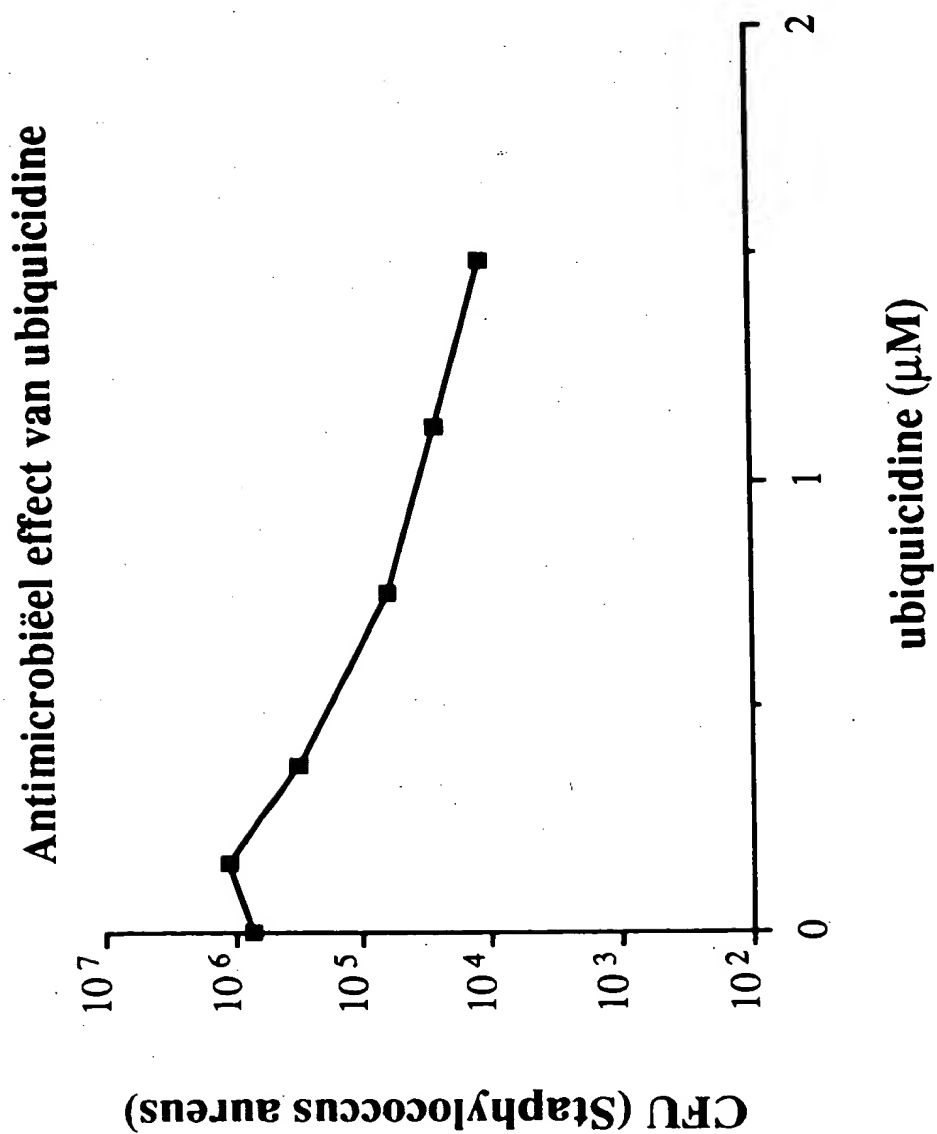


FIG. 2B



1006164

Effect van ubi (18-35) op herpes simplex virus

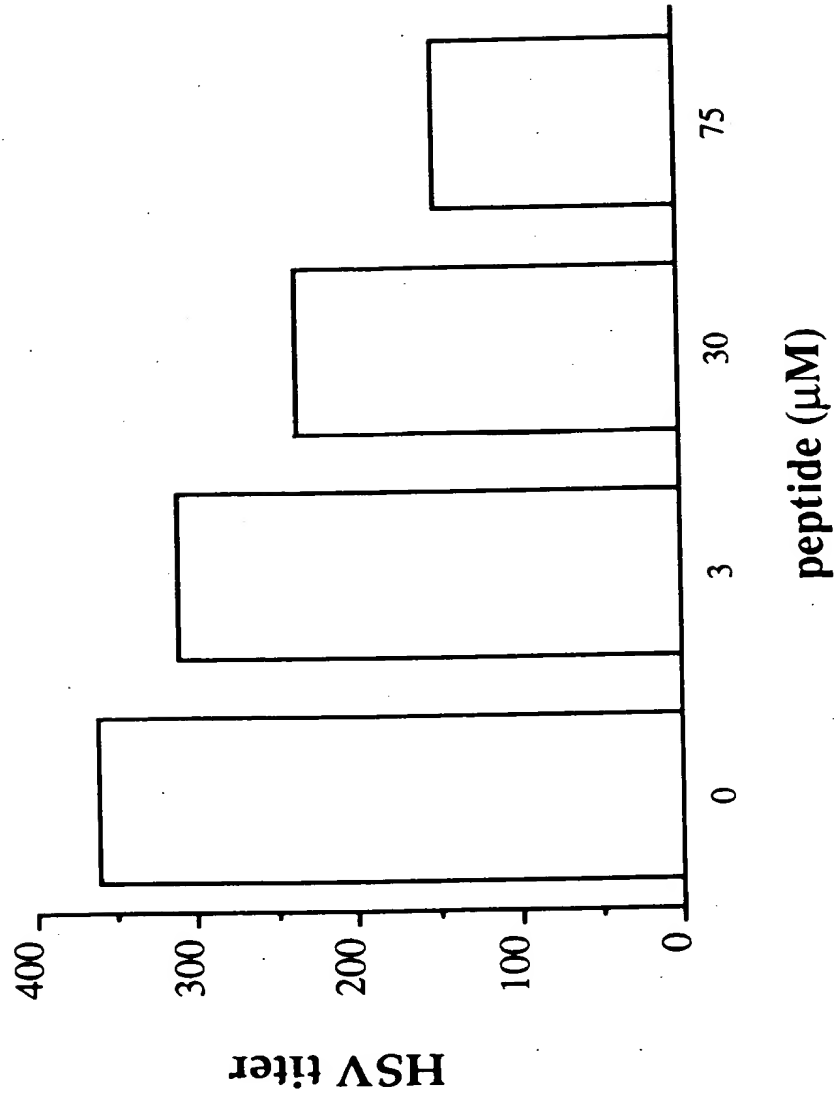


FIG. 3

10<sup>4</sup> d

10-11-2

# Effect van ubi (18-35) op Mycobacterium fortuitum

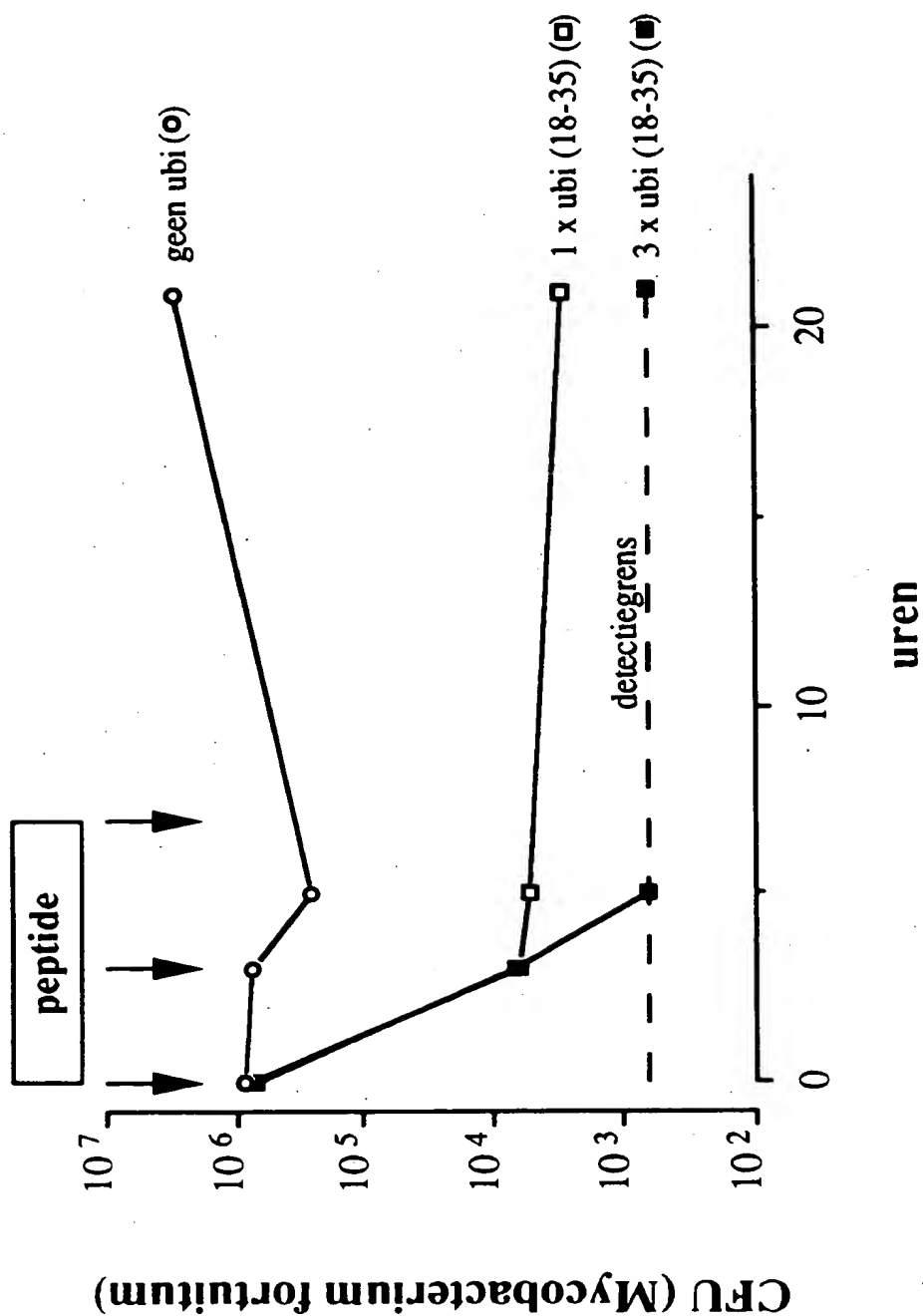


FIG. 4

1006164

10-11

# Effect van ubi (18-35) en controle peptiden op *S. aureus* en antibioticum-resistente *S. aureus* (MRSA)

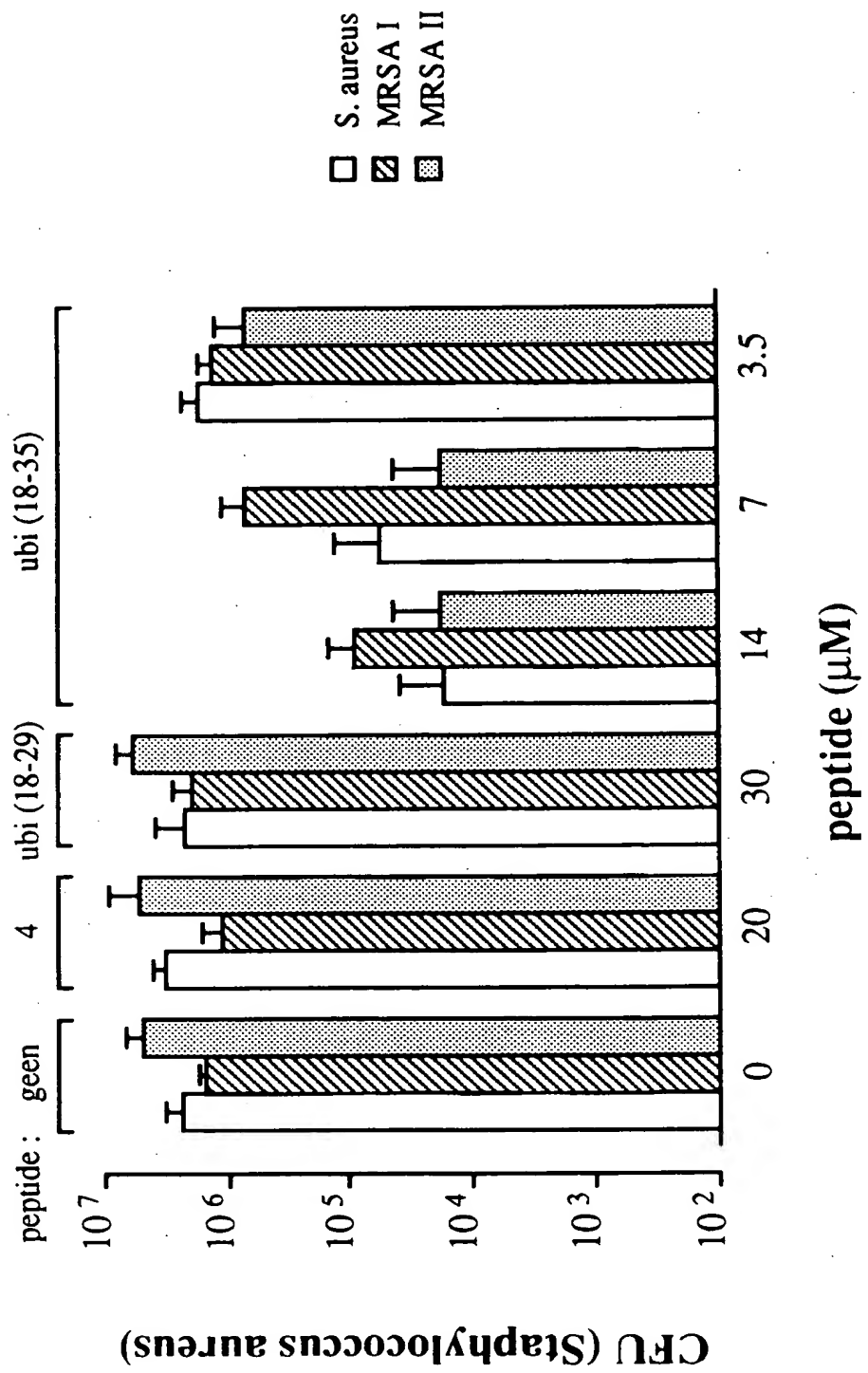


FIG. 5

1006164

1006164

Effect van ubi (18-35) en D-ala-beschermd ubi (18-35)  
op *Klebsiella pneumoniae*

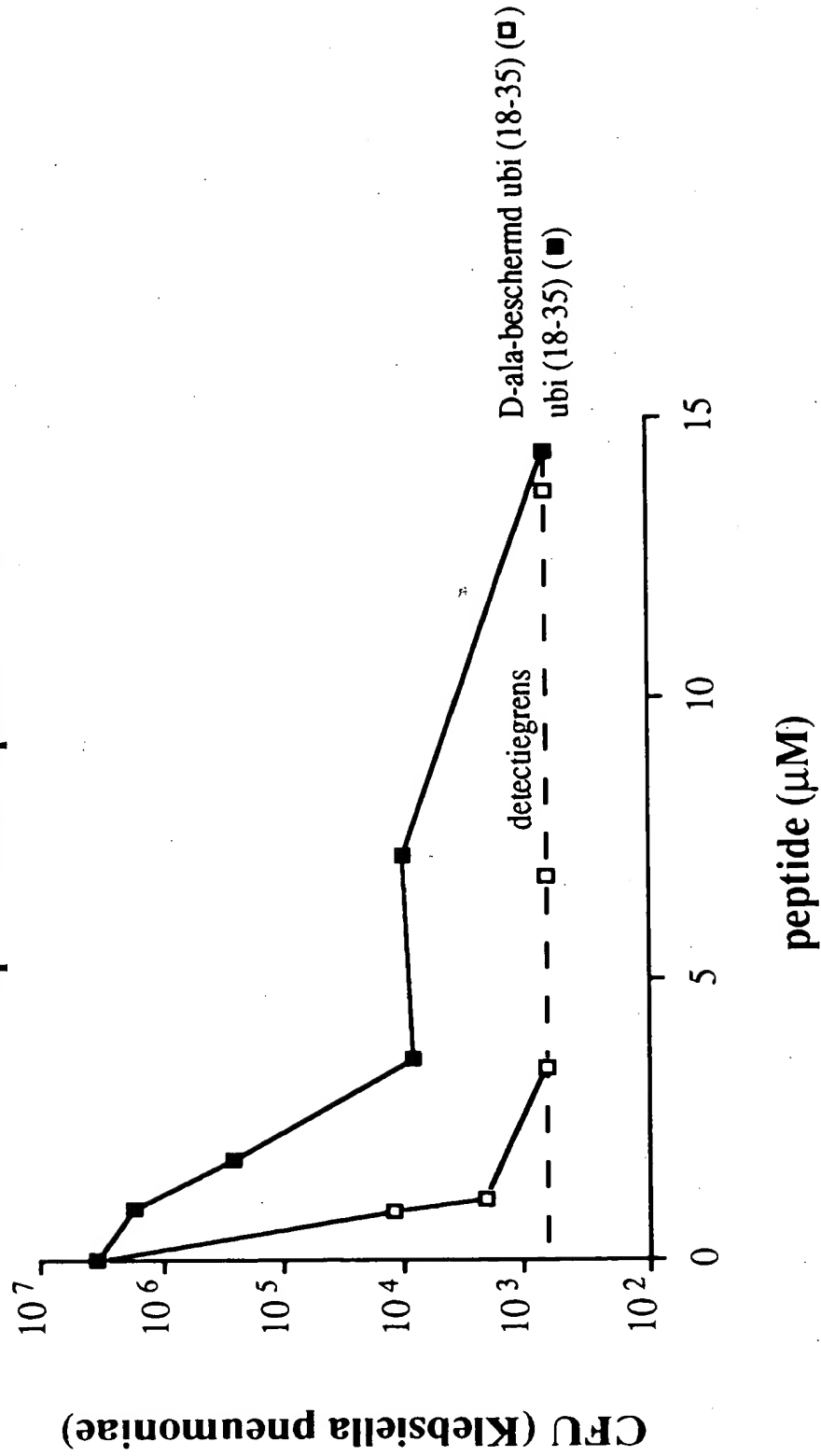


FIG. 6

Eliminatie snelheid van *S. aureus* door ubi (18-35)  
en D-ala-beschermd ubi (18-35)

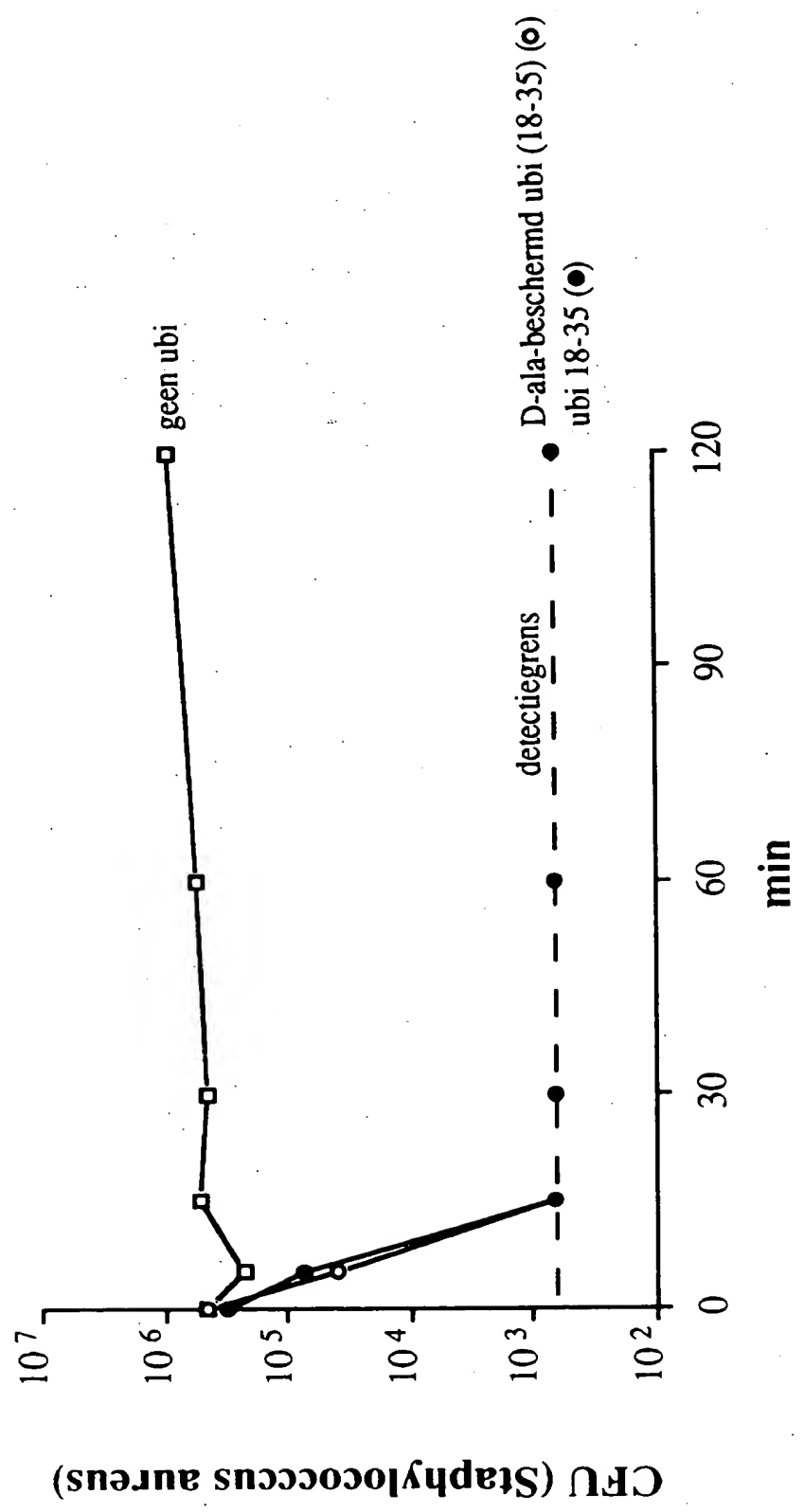
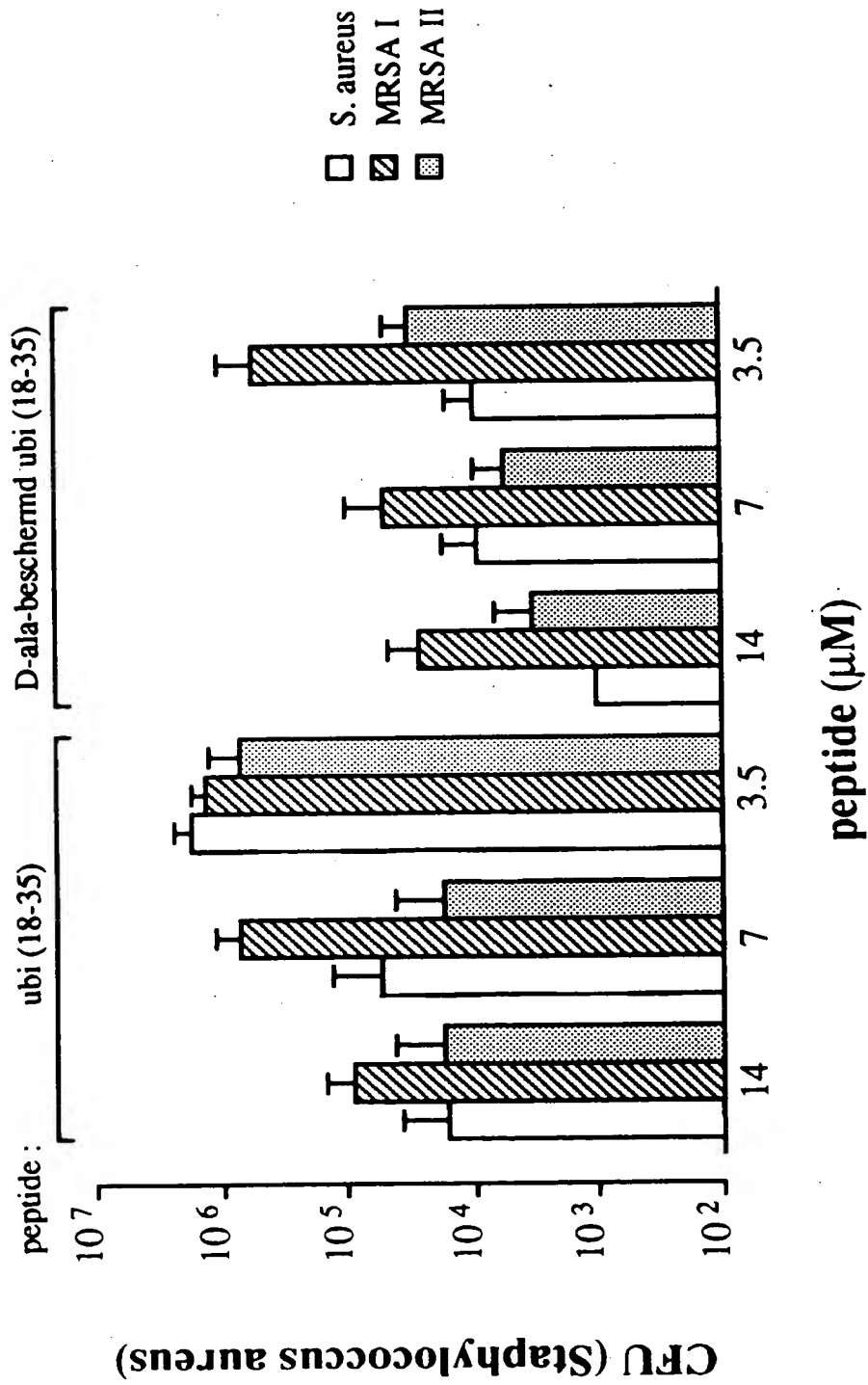


FIG. 7

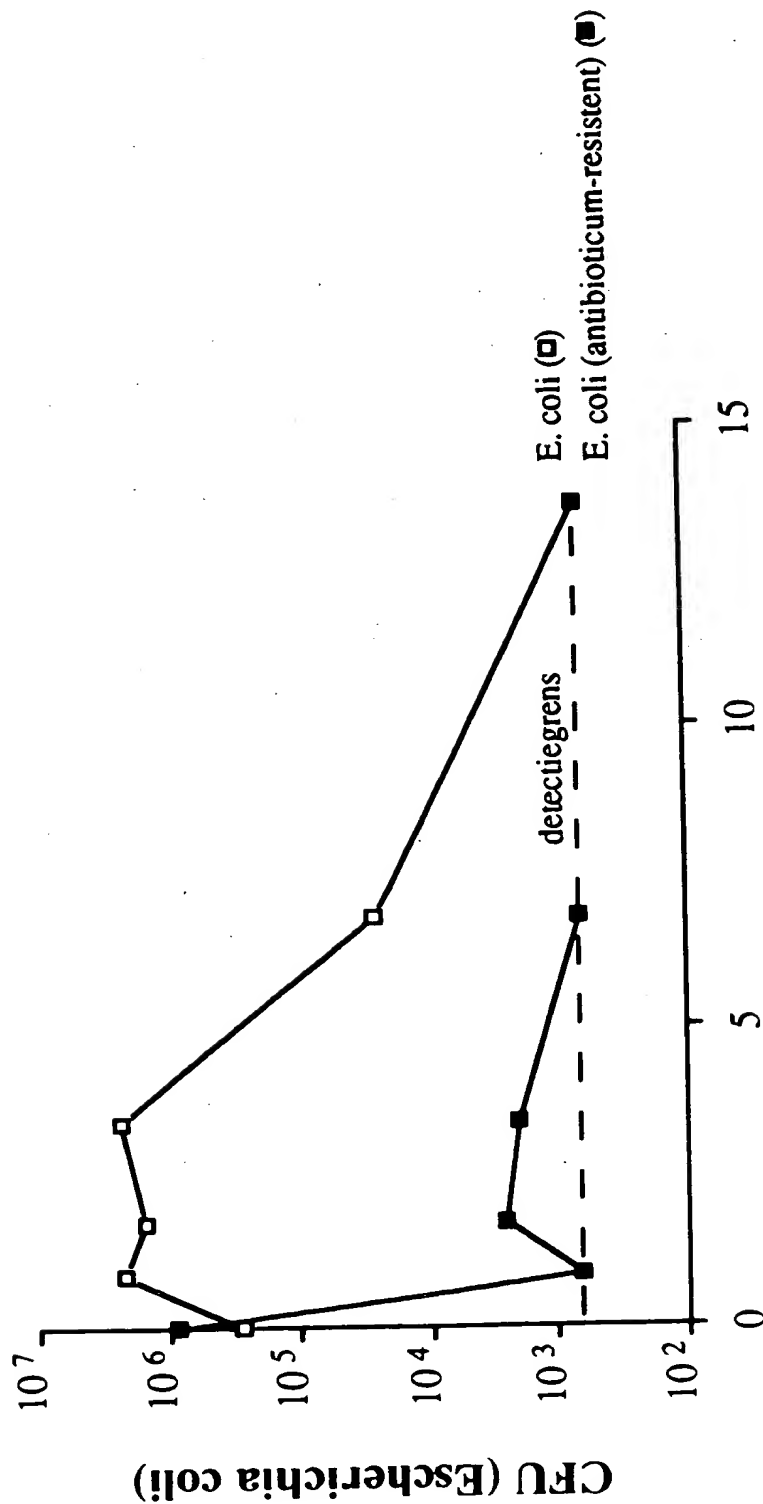
1006164

**Effect van ubi (18-35) en D-ala-beschermd ubi (18-35) op *S. aureus* en antibioticum-resistente *S. aureus* (MRSA)**



**FIG. 8**

Effect van D-ala-beschermd ubi (18-35) op *E. coli*  
en antibioticum resistente *E. coli*



peptide ( $\mu\text{M}$ )

FIG. 9

# Infectie model

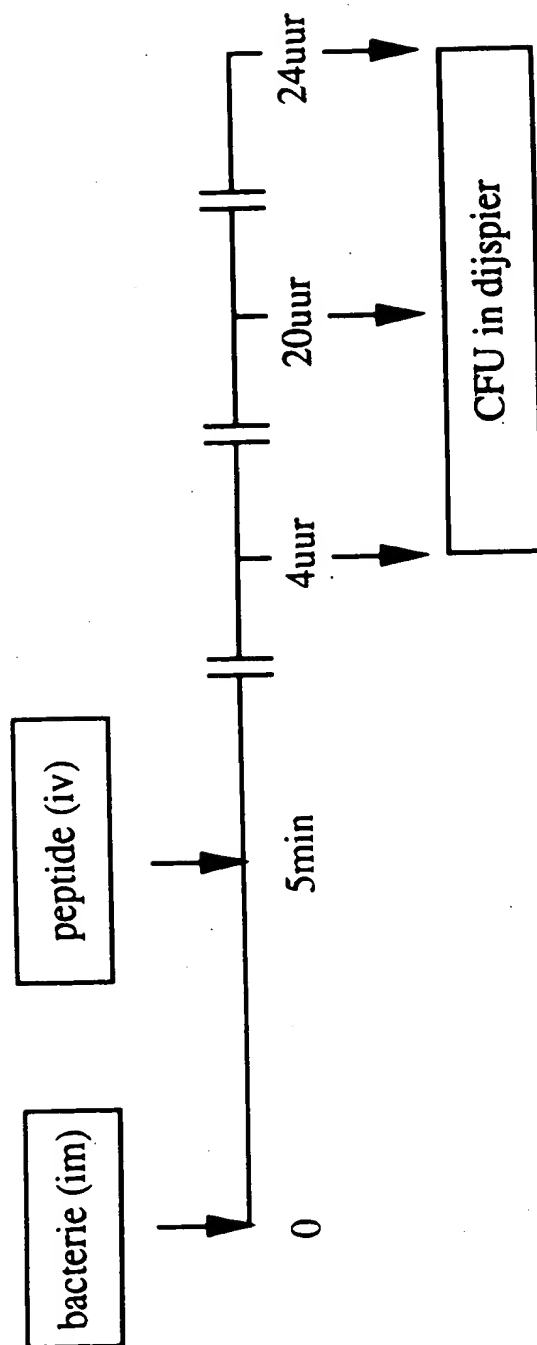


FIG. 10

10-11-14



WAL

Accumulatie van  $^{99m}\text{Tc}$ Technetium-gelabelde ubiquidine (18-35) in de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 geïnfecteerde dijspier na i.p. toediening

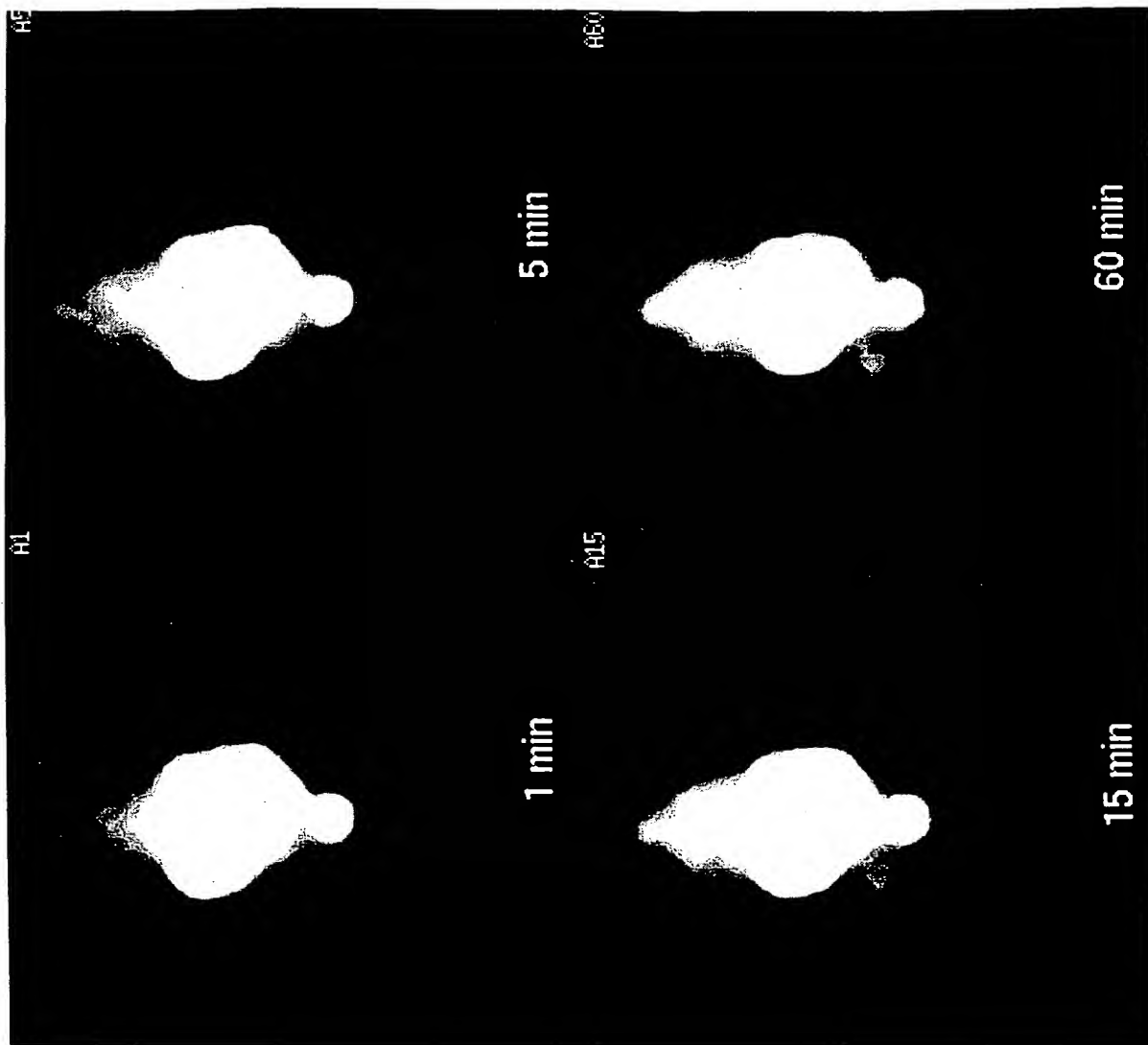


FIG. 11

1006164

211

Accumulatie van  $^{99m}\text{Tc}$ -peptide-gelabelde peptiden in de  
*Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 geïnfecteerde dijspier

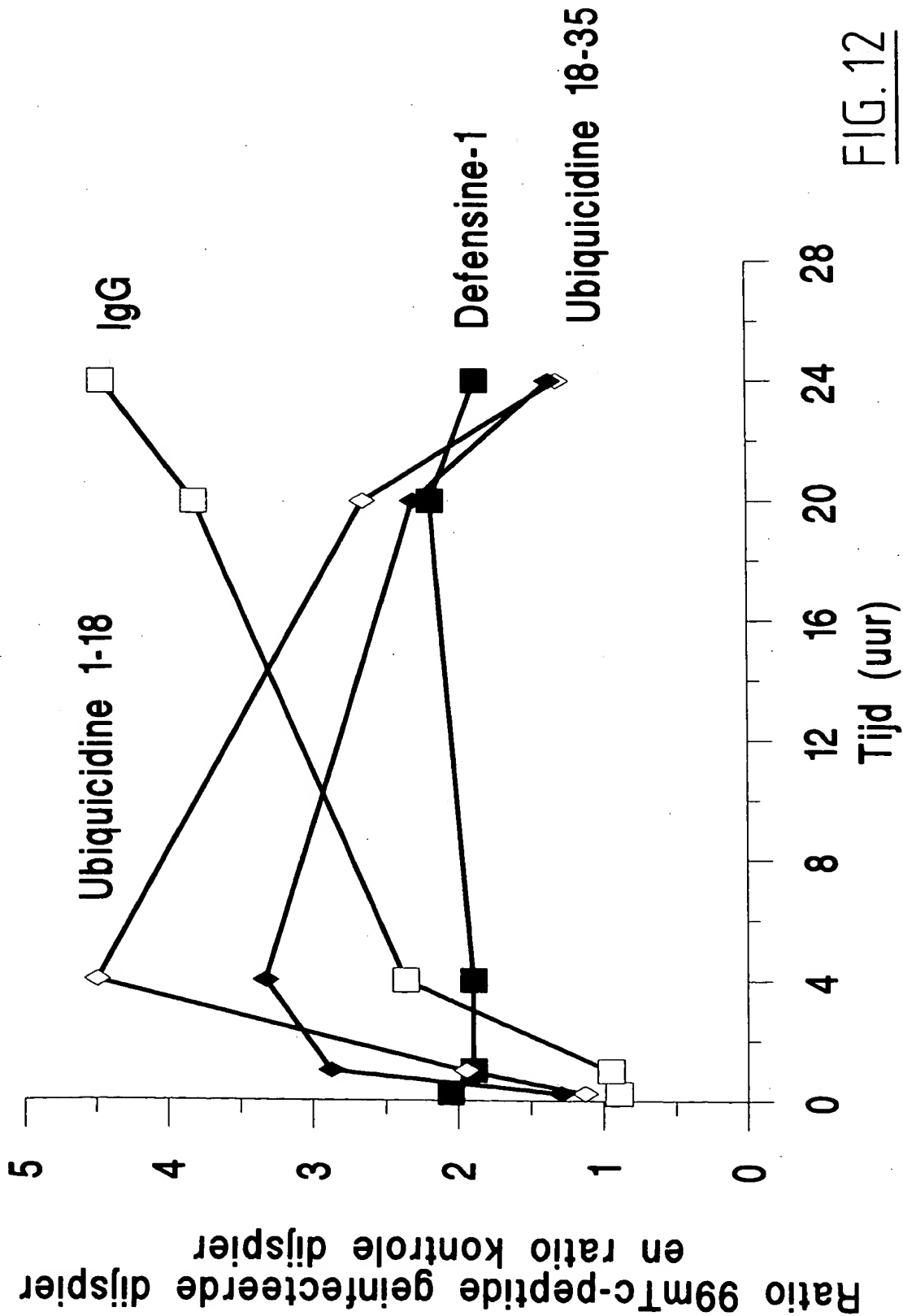


FIG. 12

1006164

**Effect van antimicrobiële peptiden op een  
experimentele *Staphylococcus aureus* infectie**

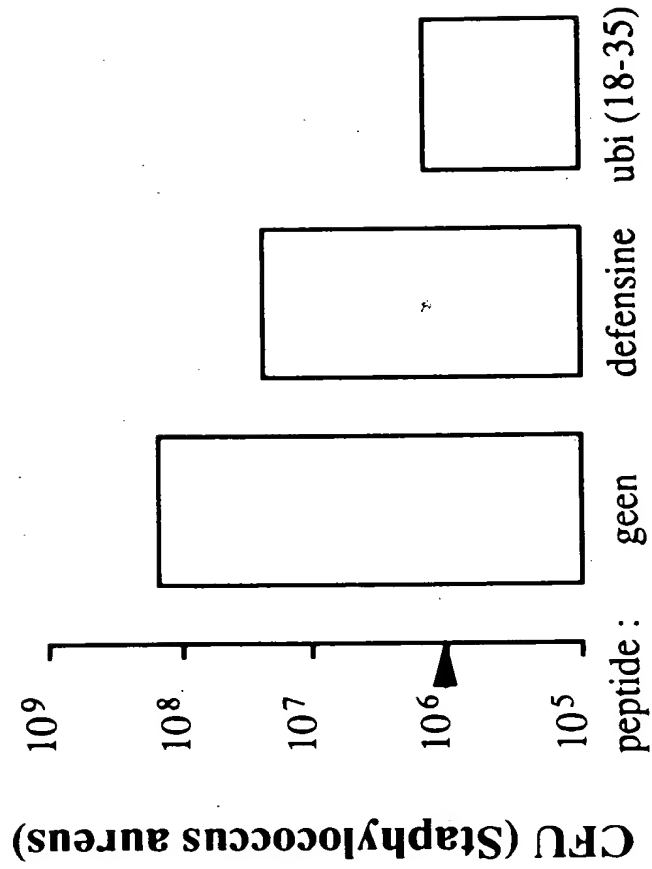


FIG. 13A

1006164

Effect van antimicrobiële peptiden op een  
experimentele *Klebsiella pneumoniae* infectie

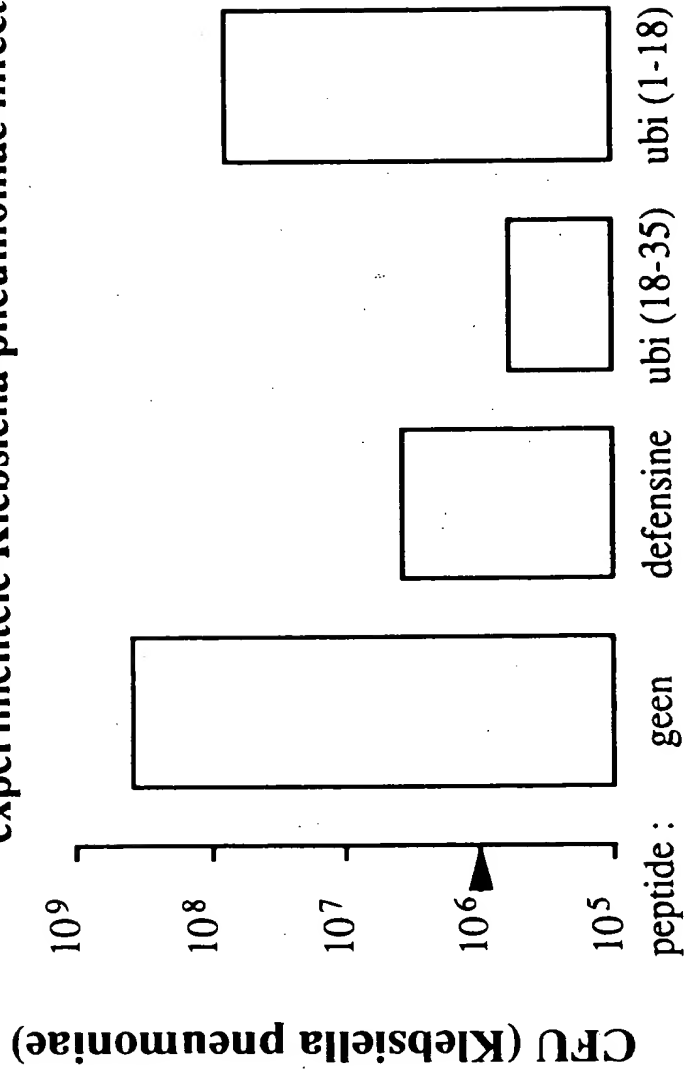


FIG. 13B